第34卷 第1期　　昆虫学报　　Vol. 34, No. 1
1991年2月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Feb., 1991

用免疫金颗粒标记鉴定舞毒蛾核型多角体病毒的抗原

丁 翠　　马 可
（中国科学院动物研究所，北京 100080）（美国马里兰大学昆虫系）

摘要 用免疫电镜金颗粒标记技术准确、快速地对舞毒蛾(*Lymantria dispar*)核型多角体病毒抗原进行了定位和鉴定。舞毒蛾病毒的多克隆抗体与同源的多角体抗原之间存在着强烈的亲和性，但与不同源的松柏锯角叶蜂（*Neodiprion sertifer*）病毒多角体抗原仅有极微弱的交叉反应。舞毒蛾病毒粒子和核衣壳抗原也能与同源的多克隆抗体作用。在被病毒感染的舞毒蛾脂肪体细胞核中，成熟的多角体被金颗粒重重标记，其外缘的游离病毒粒子和核衣壳亦被标记，但亲和力较弱。在被感染的脂肪体细胞核和质内发现一种与多角体蛋白晶体不同源的菱形结晶体。

关键词 舞毒蛾　松柏锯角叶蜂　病毒多角体抗原　病毒多克隆抗体　免疫金颗粒　菱形结晶

细胞化学标记是指利用细胞化学方法通过鉴定物（Identifiers）对组织、细胞中的目标分子进行识别和定位，如用抗体鉴定抗原、用外源凝集素识别多糖和糖蛋白、用酶识别其基质、用配体识别受体及其结合部位等；被标记的复合体能在电子显微镜下显示出目标分子的准确位置。自从 Coons 等(1941, 1942)将抗原和抗体之间的强烈亲和特性引进到免疫细胞化学研究中以来，不同标记物和标记方法已相继被发展和完善，如铁蛋白、萤光素、银颗粒、酶-基质等（Singer, 1959; Saine-marie, 1962; Sternberger, 1974）。这些方法在免疫细胞化学显微镜技术的发展中都起过不同程度的作用。Faulk 等(1971)首先在免疫电镜技术中应用胶体金颗粒标记系统，由于该标记系统具有容易制备、高的电子致密度和分辨力、与大分子结合的稳定性、不同的粒子大小以及很强的二次电子反射能力等优点，所以已广泛应用于目标分子的识别和定位。在动、植物病毒的研究中，用这种技术对病毒与寄主间关系、病毒在寄主细胞内复制机制、病毒表面抗原和结构蛋白定位等问题进行探讨的报道甚多（Frankel 等, 1987; Portner 等, 1986; Egger 等, 1987; Saito 等, 1987; Tomenius 等, 1987; Langenberg, 1985; Landini 等, 1987）。在医学病毒研究中，它已成为人类某些病毒的重要鉴定手段（Kjeldsberg, 1986; Pekovic 等, 1986）。Garzon 等(1982) 用免疫金颗粒标记法研究了昆虫浓核病毒的表面抗原，发现该抗原主要在核内被清楚标记。作者应用这一技术对舞毒蛾核型多角体病毒（NPV）进行了鉴定和定位，现将研究结果整理报道如下。

材 料 和 方 法

1. 昆虫和病毒来源 舞毒蛾（*Lymantria dispar*）取自美国农业部病理实验室，幼虫

本文于 1988 年 3 月收到。

在 24±1℃ 下用人工饲料饲养到 3 龄;舞毒蛾 NPV 取自同一实验室;松柏锯角叶蜂病毒系由 Wisconsia 大学昆虫系提供。

2. 病毒粒子提纯 经差速和蔗糖梯度(25—65% W/V)离心提纯的舞毒蛾病毒多角体 100mg → 溶于 1ml 含有 0.1mol/L Na_2CO_3、0.17 mol/L NaCl 和 0.01mol/L EDTA 稀碱液(pH = 11.0) 20 分钟→加 0.5mol/L HCl 调整到 pH = 8.5,终止反应→4000 转/分离心 30 分钟,取上清液→25,000 转/分离心 1 小时,得浅兰色粒子沉淀→用少量 PBS(磷酸缓冲液)稀释,铺于 10—45% (W/V) 蔗糖梯度上→25,000 转/分离心 1 小时,病毒粒子分为 5 层→取出,冰冻保存待用。

3. 舞毒蛾 NPV 多克隆抗体 按 Ma 等(1984)的方法制备(舞毒蛾病毒多角体需经弱碱溶解后进行免疫)。

4. 多角体和病毒粒子悬滴片的制备及免疫金颗粒标记 提纯的多角体和病毒粒子用 TBS (Tris 缓冲液) (pH = 7.2) 稀释→按不同浓度滴于带 Formvar 膜的铜网上,干燥后→ 网片置于 1% 牛血清蛋白悬滴上反应 10—20 分钟→立即与用 TBS 稀释成不同浓度的舞毒蛾多克隆抗体反应 1 小时→用含 1%牛血清蛋白的 TBS (pH = 7.2) 洗涤网片 3 次→与羊抗兔标记的金颗粒(直径 20nm) (Janssen Life Sciences products, USA)。作用 1 小时→用含0.1%牛血清蛋白的 TBS (pH = 8.2) 洗涤 3 次,干燥后 →2% 的磷钨酸(pH = 7.0) 染色 2 分钟,干后→电镜观察。

对照组处理: A. 加1%牛血清蛋白后,不与病毒多克隆抗体反应,直接与羊抗兔金颗粒作用,余同处理组。B. 加 1% 牛血清蛋白后,与被病毒抗原中和过的多克隆抗体反应,再与羊抗兔金颗粒作用,余同处理组。

5. 扫描电镜免疫金颗粒标记滴片的制备 提纯的多角体悬液按不同浓度滴于盖玻片上,干燥后与含 1% 牛血清蛋白的 TBS (pH = 7.2) 作用 20 分钟,再与舞毒蛾病毒多克隆抗体作用 1 小时,其后的制备步骤与 4 同。对照组不和多克隆抗体反应,直接与羊抗兔金颗粒作用。

6. 脂肪体细胞的超薄切片和免疫金颗粒标记 舞毒蛾 3 龄幼虫口服含 1×10^7 PIBs/ml 的舞毒蛾病毒悬液。10 天后取脂肪体→用含 0.02mol/L PBS 的 2.5% 戊二醛固定 2 小时→1% 锇酸固定 1 小时,经 PBS 洗涤后→系列酒精脱水→包埋在 Epon 812 中→切片(厚度 600—800 Å) → 置于镍网片上(网眼 300×75)→与 1% 过碘酸钠反应 1 小时,洗涤后→与 1% 牛血清蛋白(含有 PBS, pH = 7.2) 悬滴液反应 20 分钟→立即与舞毒蛾病毒多克隆抗体(1:200 稀释)作用 1 小时→用含 0.1% 牛血清蛋白的 TBS (pH = 7.4) 洗涤→与羊抗兔标记的金颗粒作用 1 小时→用含 0.1 牛血清蛋白的 TBS (pH = 8.2) 洗涤 3 次→2% 醋酸铀染色 10—15 分钟,洗涤后→柠檬酸铅染色 1—3 分钟。

对照组分三种处理: A. 不与舞毒蛾病毒多克隆抗体作用。B. 与已被舞毒蛾抗原中和过的多克隆抗体反应。C. 与非免疫的兔血清作用。 三者的其它制备步骤均与处理组相同。

结果和讨论

一、多角体和病毒粒子的标记

舞毒蛾 NPV 多克隆抗体与同源多角体抗原和松柏锯角叶蜂(*Neodiprion sertifer*)病毒多角体抗原作用的透射电镜观察结果分别见图 1 和图 2。在舞毒蛾病毒多角体表面可见许多标记金颗粒(图1:1)，说明在同源的抗原和抗体之间存在着强烈的亲和力；相反，在松柏锯角叶蜂病毒多角体表面仅偶而找到金颗粒(图 1:2)。对照组舞毒蛾病毒多角体上没有标记金颗粒(图 1:3)。Krywienczyk 等(1958)报道不同来源核型多角体之间的抗原性在很大程度上取决于其寄主所属的分类地位。这两种昆虫分属于鳞翅目和膜翅目，两者病毒之间的血清学关系应当是不密切的。Krywienczyk 等(1960)用补体结合试验证明松柏锯角叶蜂的多角体蛋白抗体除与同一目的云杉锯角叶蜂(*Diprion heryniae*)病毒多角体有强烈的交叉反应外，还与草地夜蛾(*Laphygma frugiperda*)、枞色卷蛾(*Choristoneura fumiferana*)和苹天幕毛虫(*Malacosoma americanum*)等鳞翅目昆虫的病毒多角体有程度不同的交叉反应。图 2 表明松柏锯角叶蜂病毒多角体与舞毒蛾多角体的多克隆抗体之间也有微弱的交叉关系。

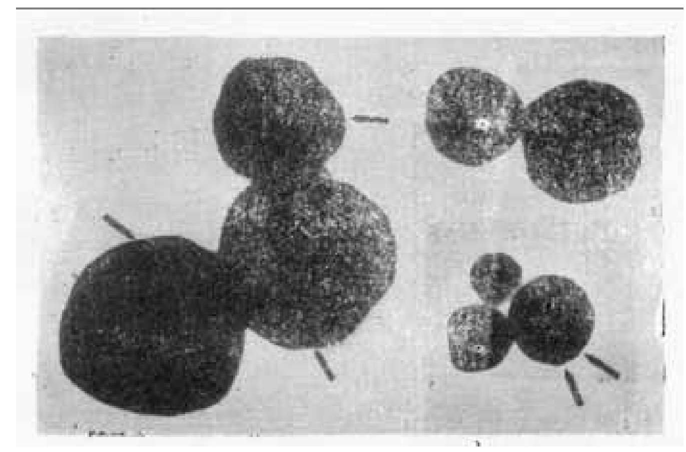


图 1　舞毒蛾病毒多角体抗体与二种病毒多角体抗原的反应

1. 被重重标记的舞毒蛾(L. dispar)病毒多角体，箭头示标记的金颗粒　×24000
2. 舞毒蛾病毒多克隆抗体与松柏锯角叶蜂(N. Seritifer)病毒多角体之间微弱的交叉反应，箭头表示几个标记金颗粒　×24000
3. 对照组舞毒蛾病毒多角体表面光滑　×24000

扫描电镜观察也显示经舞毒蛾病毒多克隆抗体处理的同源多角体上布满立体的金颗粒(图 2:1)，对照组多角体表面平洁光滑(图 2:2)。图版 I 是舞毒蛾病毒的病毒粒子抗原被标记的情况，由于在制备病毒多克隆抗体时，预先用弱碱将多角体溶解，所以它包括病毒粒子和核衣壳的抗体。从图中可以看出，病毒粒子，特别是它的囊膜部分和多克隆抗体的亲和力较强(图版 I:1)，核衣壳抗原和多克隆抗体的反应较弱(图版 I:2)。对照的病毒粒子和核衣壳上则未见金颗粒(图版 I:3)。

二、脂肪体细胞中病毒抗原的标记

在感染病毒 10 天后的舞毒蛾脂肪体细胞核中，可以见到许多成熟的病毒多角体和少量未被包埋进多角体的游离病毒粒子及核衣壳，前者被金颗粒标记得较重，后者只被轻微标记(图版 II)，其原因可能是因为在制备多克隆抗体时，多角体蛋白的量远远多于病毒粒子，所以多克隆抗体对前者的亲和力较大。对照的多角体和病毒粒子均未被标记。我

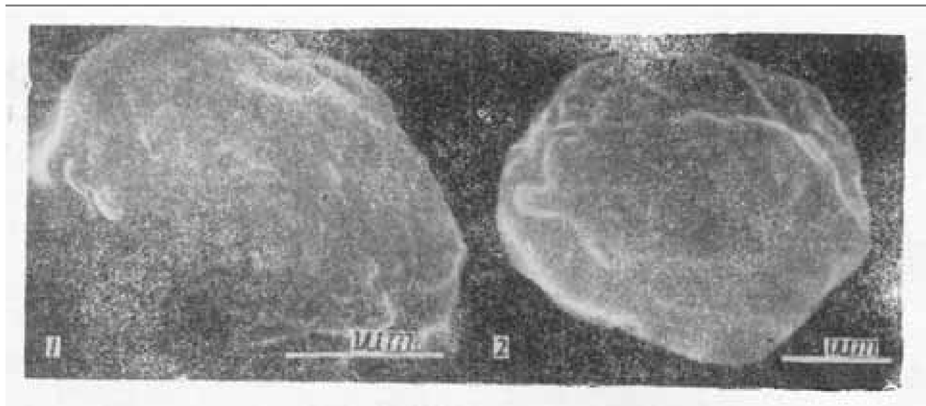


图 2 舞毒蛾病毒多角体抗体与其抗原的反应

1. 扫描电镜照片，示被众多金颗粒标记的舞毒蛾病毒多角体

2. 扫描电镜照片，示对照组舞毒蛾病毒多角体，无标记金颗粒可见

们认为，若要标记病毒粒子抗原，可用大量提纯的病毒粒子抗原制备多抗，也可制备病毒单粒子的单克隆抗体，其鉴定效果应当优于多角体病毒的多抗。为能制备多种病毒抗原的抗，利用免疫金颗粒标记技术，就可能对病毒侵入的早期机制和病毒间的亲缘关系有更深入的理解。Saito 等(1987)的工作就是一个很好的例子，他们用这种方法对烟草花叶病毒的两种结构蛋白在寄主细胞中的复制进行了定位。

另一个使人感兴趣的现象是在被感染的脂肪体细胞中常见到一种菱形晶体，它极象昆虫痘病毒感染脂肪体后出现的纺锤体，但数量较少，分布也不同，这种菱形晶体在细胞核和细胞质内均有发现，其性质与功能尚不清楚。有人认为它与多角体蛋白相同或是多角体蛋白的前身，但没有试验证据。Longworth 等 (1980)在被感染的苹褐卷蛾 *Epiphyas postvittana* 脂肪体细胞质中也发现这种菱形晶体，他们通过复杂的染色和化学分析初步肯定它不同于多角体蛋白晶体。我们用免疫金颗粒标记技术极其准确而快速地证明：这种菱形晶体与多角体蛋白晶体之间没有共同的抗原性，因为它不能被金颗粒标记（图版 III)。这种菱形晶体可能是寄主细胞被感染后受刺激所形成的某种代谢产物，也许在病毒复制过程中并不起任何作用。

免疫电镜金颗粒标记技术在昆虫病毒复制机制的研究和建立准确的病毒血清分类系统方面都有极为广泛的应用前景，不久的将来，它也许会成为其它实验方法所无法替代的有力工具 (Bendayan. 1984)。

参 考 文 献

Bendayan, M. 1984 Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry: methods, applications and limitations. *J. Electron Microscopy Technique* 1: 243—70.

Coons, A. H. et al. 1941 Immunological properties of antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **47**: 200—2.

Coons, A. H. et al. 1942 The demonstration of pneumococcal antigen in tissue by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol* **45**: 159—70.

Egger, K. B. 1987 Association of poliovirus proteins of the P_2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visulized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* **160**: 220—6.

Faulk, W. P. et al. 1971 An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* 8: 1081—3.

Frankel, G. et al. 1987 Fractionation of Theiler's virus-infected BHK 21 cell homogenates: Isolation of virus-induced membranes. *Virology* 158: 452—5.

Garzon, S. et al. 1982 Ultrastructural localization of viral antigens using the protein A-gold technique. *J. Virological Methods* 5: 67—73.

Kjeldsberg, E. 1986 Demonstration of calicivirus in human faces by immunosorbent and immunogold-labelling electron microscopy methods. *J. Virological Methods* 14: 321—33.

Krywienczyk, J. et al. 1958 Serological relationship of viruses from some Lepidoptera insects. *Virology* 5: 476—80.

Krywienczyk, J. et al. 1960 Serological relationship of viruses from some lepidopterous and hymenopterous insects. *Virology* 10: 308—15.

Landini, M. P. et al. 1987 Human cytomegovirus structural components: intracellular and intraviral localization of P28 and P65-69 by immunoelectron microscopy. *Virus Research* 8: 15—23.

Langenberg, W. G. 1985 Immunoelectron microscopy of wheat spindle streak and soil-borne wheat mosaic virus doubly infected wheat. *J. Ultrastructure Research* 92: 72—9.

Longworth, J. F. et al. 1980 A nuclear polyhedrosis virus of the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Invertebrate Pathology* 35: 84—7.

Ma, M. et al. 1984 Plastic-bead Elis A: An inexpensive epidemiological tool for detecting gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol* 77: 537—40.

Pekovic, D. et al. 1986 Immunogold labeling of HILV-III/LAV in H_9 cells studied by transmission electron microscopy. *J. Virological Methods* 13: 265—9.

Portner, A. et al. 1986 Localization of P. NP, and M proteins on sendai virus nucleocapsid using immunogold labeling. *Virology* 150: 469—78.

Saine-Marie, G. 1962 A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem Cytochem* 10: 250—6.

Saito, T. 1987 Immunocytochemical localization of the 130K and 180K proteins of tobacco mosaic virus. *Virology* 160: 477—81.

Singer, S. J. 1959 Preparation of our electron dense antibody conjugate. *Nature* 183: 1523—4.

Sternberger, L. A. 1974 Immunocytochemistry. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall.

Tomenius, K. et al. 1987 Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* 160: 363—71.

IDENTIFICATION OF ANTIGEN OF GYPSY MOTH NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS BY USING IMMUNOGOLD LABELLING TECHNIQUE

DING TSUEY

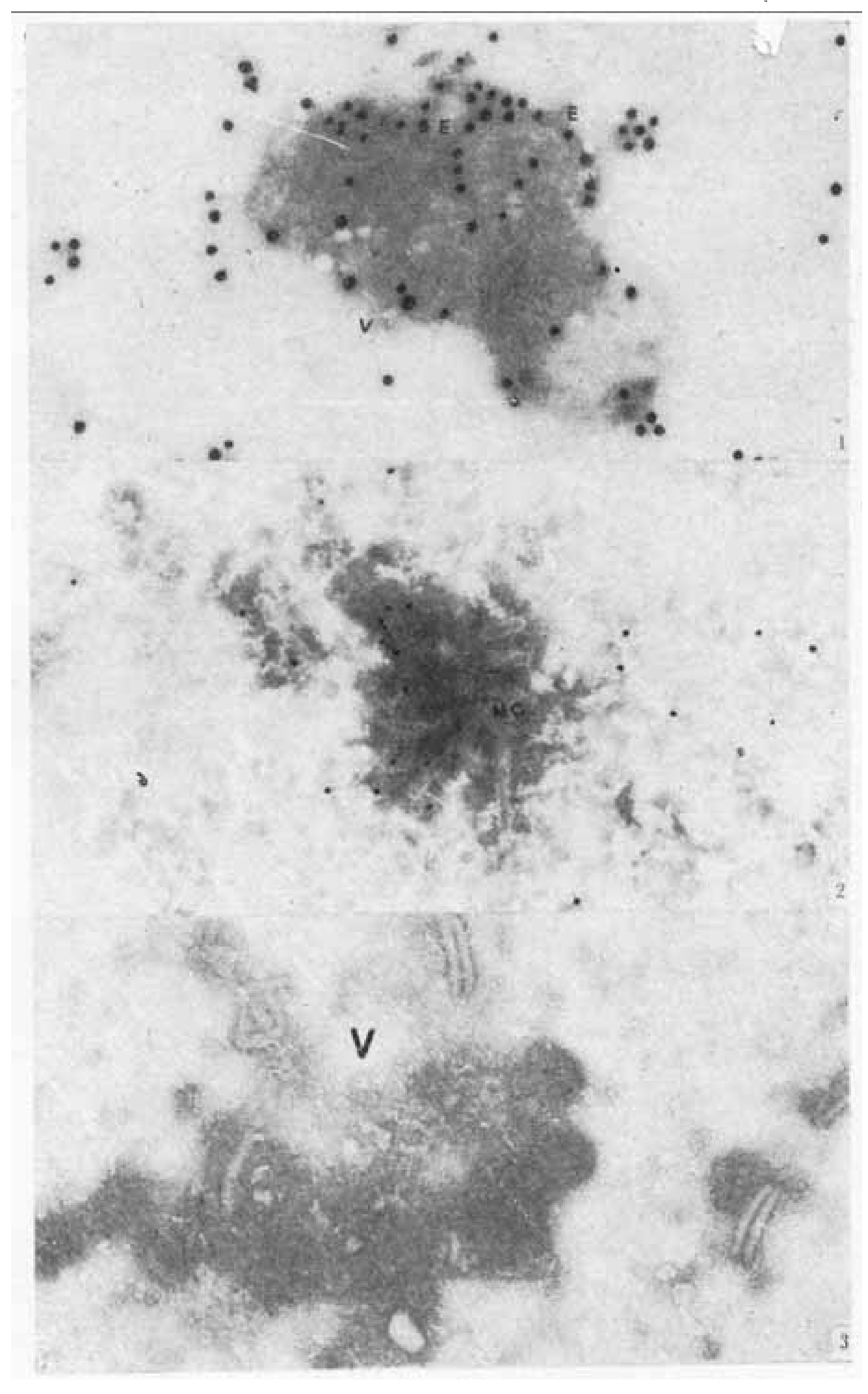
(*Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing* 100080)

MICHAEL MA

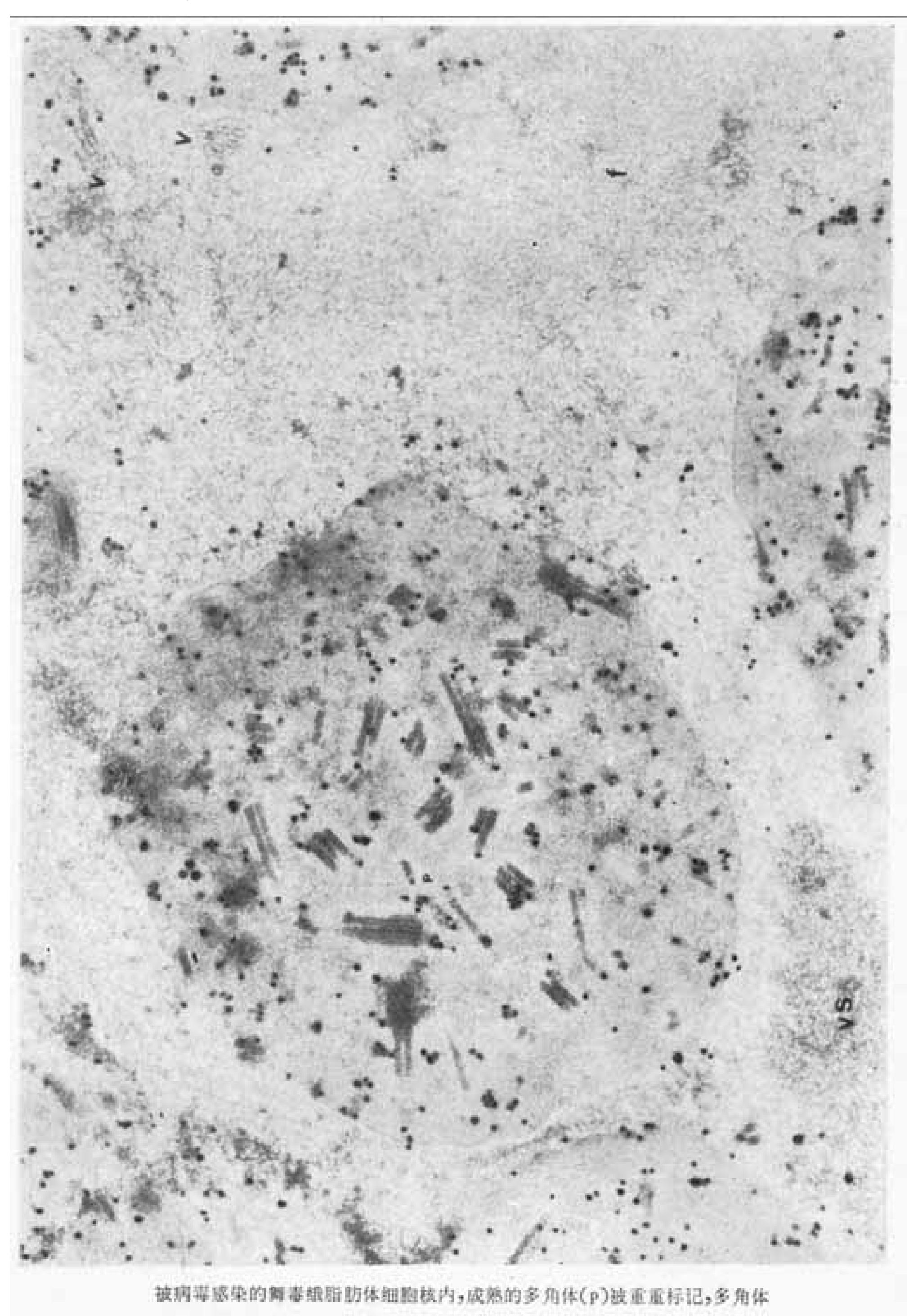
(*Department of Entomology, University of Maryland, USA*)

The antigen of gypsy moth *Lymantria dispar* nuclear polyhydrosis virus (NPV) has been localized and identified with scanning and transmission electron microscopy by using immunogold technique. The electron micrographs showed that strong reaction existed between the antigen of polyhedra of gypsy moth NPV and its polycolonal antibody while only weaker cross-reaction occurred between the antigen of polyhedra of European pine sawfly *Neodiprion sertifer* NPV and poly colonal antibody of gypsy moth NPV. The virions and nucleocapsids of gypsy moth NPV could also react with polycolonal antibody. A lot of mature polyhedra and virions of gypsy moth NPV were labelled by immuno-gold particles in the infected adipose cells and the micrographs indicated that the antigenicity of virion was weaker than that of polyhedron. Virions and nucleocapsids outside the polyhedra could also be labelled. It has been found that some bipyramid inclusions emerged in the nucleus and cytoplasm of adipose cell but their antigenicity differed entirely from the polyhedra.

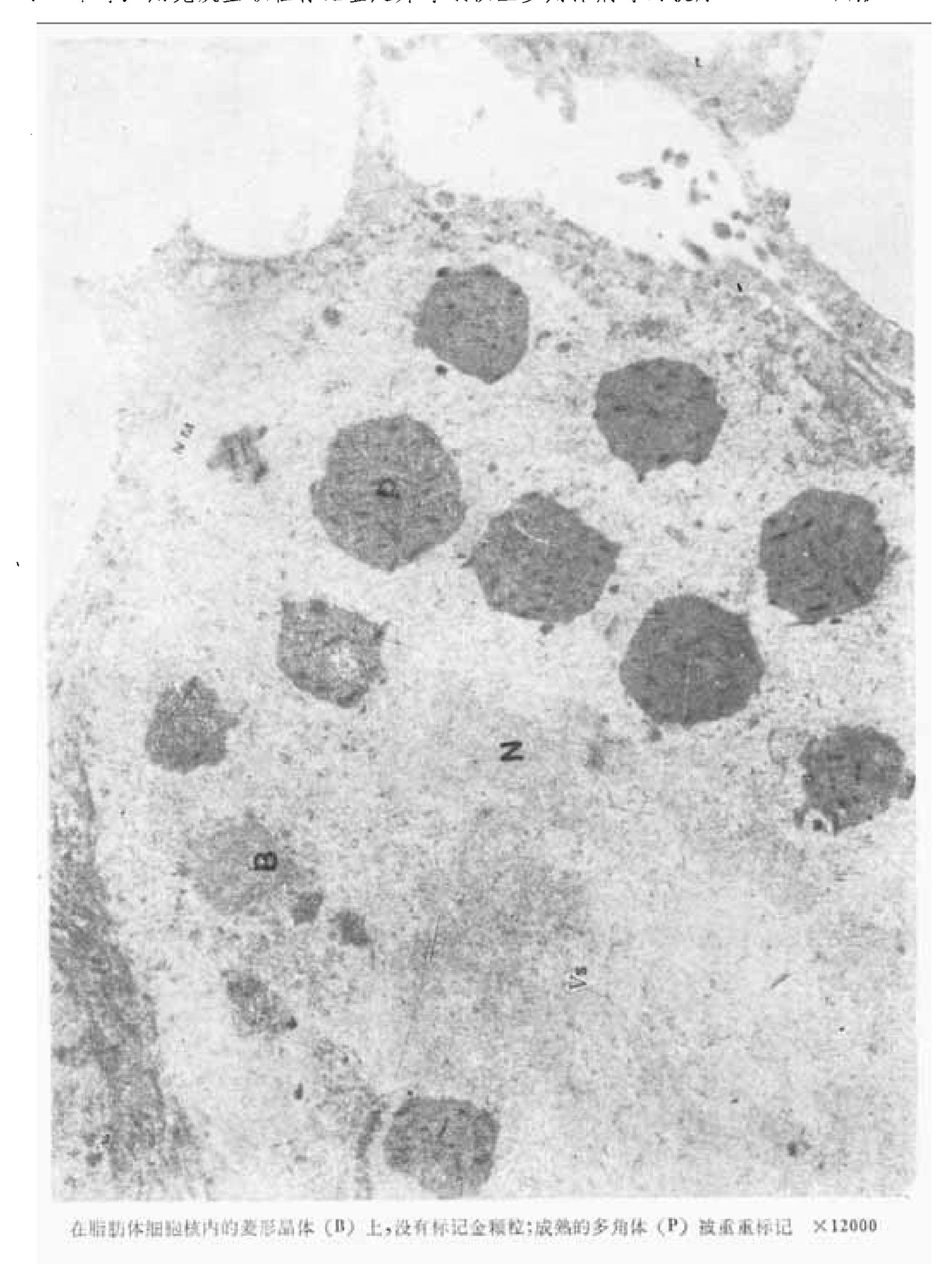
Key words *Lymantria dispar*——*Neodiprion sertifer*——antigen of NPV polyhedra ——polycolonal NPV antibody——bipyramid inclusion



1. 被标记的舞毒蛾病毒的病毒粒子（E为囊膜，V 为囊膜内的核衣壳） ×30000
2. 被标记的舞毒蛾病毒的核衣壳（NC） ×30000
3. 对照组舞毒蛾病毒的病毒粒子和核衣壳（V） ×30000



被病毒感染的舞毒蛾脂肪体细胞核内，成熟的多角体(p)被重重标记，多角体外缘的核衣壳（V）亦被标记。f. 脂肪细胞，vs. 病毒发生基质　×56000



在脂肪体细胞核内的菱形晶体（B）上，没有标记金颗粒；成熟的多角体（P）被重重标记　×12000